http://www.journals.zju.edu.cn/med

乙酰肝素酶基因siRNA表达载体的构建及其沉寂作用

刘晓艳[1],方 红[1],羊正纲[2],张 妤[1],阮黎明[1],蒋筱凌[1]
(浙江大学医学院 附属第一医院 1.皮肤科、2.传染病研究所,浙江 杭州 310003)

[摘 要] 目的:构建针对人乙酰肝素酶(HPSE)基因的小干扰RNA(siRNA)及其表达载体,转染细胞后观察其对HPSE基因的干扰作用。方法:设计HPSE靶向的发夹状siRNA,合成两条互补的寡核苷酸链,退火后连接入pRNATU6.1载体,转化扩增后进行序列测定。用脂质体包裹转染人恶性黑素瘤细胞A375,采用半定量PCR测定HPSE基因RNA水平变化,Western blot检测HPSE蛋白表达的变化。结果:将针对HPSE基因的siRNA的双链寡核苷酸片段克隆到pRNATU6.1载体,经过阳性菌落PCR鉴定与测序,结果正确;转染A375细胞后,半定量PCR和Western blot检测显示,HPSE基因和蛋白的表达水平明显降低($P<0.05$)。结论:成功构建了针对HPSE基因的siRNA载体,转染细胞后可抑制HPSE的表达。

[关键词] 寡核苷酸类,反义;葡糖醛酸糖苷酶;RNA,小分子干扰;RNA干扰;乙酰肝素酶;基因表达;黑色素瘤
[中图分类号] R 739.5 [文献标识码] A [文章编号] 1008-9292(2007)06-0581-07

Construction of heparanase gene-targeted small interfering RNA and its gene silencing effect

LIU Xiao-yan, FANG Hong, YANG Zheng-gang, et al (*The First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou* 310003, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To construct heparanase gene-targeted small interfering RNA (siRNA) and its expression vector and to observe its interference effect on the expression of heparanase gene in human malignant melanoma A375 cell. **Methods**: Heparanase gene-targeted hairpin siRNA was designed, two complementary oligonucleotide strand was synthesized and inserted into pRNATU6.1 vector, which was then identified by PCR and sequencing. Human malignant melanoma A375 cells were transfected with the constructed vector using lipofectamine method. Semi-quantitative PCR was performed to evaluate the heparanase-mRNA expression levels, and Western blot was performed to evaluate the expression of heparanase protein. **Results**: The vector containing siRNA was identified by PCR and sequencing; the results of semi-quantitative PCR and Western blot showed that the expression levels of both heparanase RNA and protein in

收稿日期:2006-12-26 **修回日期**:2007-04-10
基金项目:浙江省教育厅资助项目(20051085).
作者简介:刘晓艳(1976—),女,硕士,主治医师,从事皮肤科工作.
通讯作者:方 红(1958—),女,硕士,主任医师,硕导,从事皮肤科工作;E-mail:fanghongzy@sina.com

transfected A375 cells were decreased significantly($P<0.05$). **Conclusion**: The heparanase gene-targeted siRNA and its vector were successfully constructed, which can reduce the heparanase gene and protein expression in transfected cells.

[**Key words**] Oligonucleotides, antisense; Glucuronidase; RNA, small interfering; RNA interference; Heparanase; Gene express; Melanoma

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2007,36(6):581-587.]

乙酰肝素酶(heparanase,HPSE)是新近克隆出来的能裂解硫酸乙酰肝素蛋白多糖的内源性糖苷内切酶,能介导细胞黏附,降解细胞外基质及基底膜,参与肿瘤血管生成。HPSE 与肿瘤侵袭转移密切相关,已成为目前研究抗肿瘤侵袭转移的新靶点[1-2]。

RNA 干扰(RNA interference,RNAi)是由双链 RNA 引发的转录后基因沉默(posttranscriptional gene silencing,PTGS)现象。RNAi 的作用机制是通过活化的小干扰 RNA(small interference RNA,siRNA)靶向降解目的mRNA,从而使目的基因表达沉默[3-6]。该技术能够有效使转录后基因沉默,甚至可以代替基因敲除,是目前简单而高效阻断哺乳动物细胞内特异基因表达的最有效方法。因此,我们成功构建HPSE siRNA 表达载体,将有助于阐明HPSE 在恶性黑素瘤及其他肿瘤侵袭转移中的作用机制,拓展肿瘤转移基因治疗的思路,为今后研制更有效的抗恶性黑素瘤(malignant melanoma,MM)的基因药物提供实验依据和理论基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与材料 A375 人恶性黑色素瘤细胞株购自中国科学院上海细胞生物研究所,大肠杆菌DH5a 菌株由浙江大学传染病研究所羊正纲博士惠赠(原购自德国 Novagen 公司),siRNA 真核表达载体 pRNATU6.1 购于上海康成生物公司(载体原始来源为 GenScript 公司,他们对载体进行了改造,改造的部分包括荧光Marker 和U6 起动子区域);BamH Ⅰ、Hind Ⅲ限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶(MBI 公司),凝胶回收试剂盒(TaKaRa 公司),DMEM、Opti-MEM、SSC、SOC 培养基(GIBCO 公司),胎牛血清(杭州四季青公司),QIAGEN plasmid mini kit 试剂盒(QIAGEN 公司),Trizol(Invitrigen 公司),M-MLV 逆转录酶(Promage 公司),TaqDNA 酶、dNTPs、DNA Marker 和质粒抽提试剂盒(上海生工生物工程服务有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 64-nt 寡核苷酸链设计与合成:根据已发表的基因库中的HPSE-mRNA 的cDNA 序列(NM_006665),选出G/C 含量在50%左右且符合要求的19-nt 序列,用 BLAST 进行匹配。从中选出与HPSE 以外的基因组没有同源性的3 条最佳序列。按照pSUPER 中构建发夹状短链 RNA 的原则。5-3 分别为:BamH Ⅰ酶切位点+靶向正义链+发夹状结构+靶向反义链+终止序列+Hind Ⅲ酶切位点。将选定的2 条序列分别配成64 个碱基的寡核苷酸链,然后按照碱基互补配对的原则,配对成双链;另一对为实验中采用的阴性对照,其为通用序列,在人和小鼠的基因组中都没有同源位点(表1)。8 条寡核苷酸由上海生工生物工程服务有限公司合成。

1.2.2 寡核苷酸链退火形成双链:进行DNA 合成,对合成好的DNA 进行稀释和退火。用灭菌的dH_2O 溶解合成的寡核苷酸链。使其终浓度为1 mg/ml。正义链寡核苷酸1 μl、反义链寡核苷酸1 μl、20×SSC 1 μl、dH_2O 17 μl 形成20 μl 的反应体系。混匀后95℃加热10 min,室温静置1 h,稀释至终浓度10 ng/μl。

1.2.3 pRNATU6.1 质粒的线性化和纯化回收:Hind Ⅲ和 BamH Ⅰ双酶切质粒 pRNATU6.1,建立10 μl 酶切反应体系:dH_2O 5.5 μl、K Buffer 1.0 μl、pRNATU6.1 3.0 μl、

表1 设计的4对64-nt寡核苷酸序列

Table 1 Four pairs of designed olignucleotide sequence

序列号	设计的各对64-nt寡核苷酸序列
I-1	5'GATCCCGAAGGTCTGGTTAGGAGAATTCAAGAGATTCTCCTAACCAGACCTTCTTTTTTCCAAA 3'
I-2	5'AGCTTTTGGAAAAAAGAAGGTCTGGTTAGGAGAATCTCTTGAATTCTCCTAACCAGACCTTCGG 3'
Ⅱ-1	5'GATCCCGAGAAGGAAGCTTCGAGTATTCAAGAGATACTCGAAGCTTCCTTCTCTTTTTTCCAAA 3'
Ⅱ-2	5'AGCTTTTGGAAAAAAGAGAAGGAAGCTTCGAGTATCTCTTGAATACTCGAAGCTTCCTTCTCGG 3'
Ⅲ-1	5'GATCCCATATGGATCCATCCCTCCTTTCAAGAGAAGGAGGGATGGATCCATATTTTTTTCCAAA 3'
Ⅲ-2	5'AGCTTTTGGAAAAAAATATGGATCCATCCCTCCTTCTC TTGAAAGGAGGGATGGATCCATATGG 3'
Neg-1	5'GATCCCGTTCTCCGAACGTGTCACGTTCAAGAGAACGTGACACGTTCGGAGAACTTTTTTCCAAA 3'
Neg-2	5'AGCTTTTGGAAAAAAGTTCTCCGAACGTGTCACGTCTCTTGAACGTGACACGTTCGGAGAACGG 3'

Hind Ⅲ 0.25 μl，37℃孵育1.5 h后加入Bam HI 0.25 μl，继续37℃孵育4 h。1%琼脂糖凝胶纯化，切胶回收线性化的质粒pRNATU6.1。

1.2.4 重组质粒pRNATU6.1/HPSE-siRNA的构建：T4DNA连接酶连接线性化质粒pRNATU6.1和退火寡核苷酸链，建立10 μl连接反应体系：dH_2O 5.5 μl、退火寡核苷酸链1 μl、线性化pRNATU6.1质粒(0.1 μg/μl)1 μl、10×Buffer 2 μl、T4 DNA连接酶0.5 μl，22℃连接2 h。将5 μl连接产物加入DH5α感受态细胞进行转化，将转化产物加入900 μl的SOC培养基中，37℃和150 r/min条件下摇床培养1 h；收集菌液，分100 μl和900 μl涂布LB平板。将克隆成功的重组质粒命名为pRNATU6.1/HPSE-siRNA。

1.2.5 阳性克隆pRNATU6.1/HPSE-siRNA的筛选和鉴定：每组样品挑取两个单菌落，使用载体多克隆位点两端的引物进行PCR扩增检测阳性菌落。引物序列为上游：5'TACGATACAAGGCTGTTAGAGAG3'，下游：5'TAGAAGGCACAGTCGAGG3'。含插入HPSE-siRNA的扩增产物是316 bp，扩增后使用5 μl PCR产物上样，1.5%琼脂糖凝胶电泳。挑取1、2、3和4号菌落于3 ml LB液体培养基中，37℃和200 r/min条件下摇床培养过夜。使用质粒抽提试剂盒提取质粒，使用载体上的引物将质粒DNA送上海生工生物工程服务有限公司测序。

1.2.6 细胞培养及瞬时转染：使用QIAGEN plasmid mini kit试剂盒进行不含内毒素质粒的提取。A375细胞培养于含体积比为10%胎牛血清的DMEM培养液中，接种于6孔板。待细胞密度长至约80%时，使用Lipofectamine^{M}2000进行转染。每孔加入500 μl Opti-MEM+10 μl Lipofectamine^{M}2000+4 μg重组pRNATU6.1/HPSE siRNA，设HPSE1-siRNA、HPSE2-siRNA、HPSE3-siRNA和Negative-siRNA组，同时设空白对照组(仅加Opti-MEM)和Lipofectamine^M 2000组(仅加Opti-MEM+Lipofectamine^{M}2000)，各组复6孔。转染48 h后观察细胞形态较好，贴壁密度达90%，通过荧光显微镜观察实验组，转染效率达60%～70%。

1.2.7 用半定量逆转录-聚合酶联反应(RT-PCR)检测各组HPSE-mRNA的表达：取各实验组A375培养细胞(各组复3孔)，PBS漂洗2次，以Trizol试剂提取总RNA，在1%甲醛变性凝胶上电泳验证RNA完整性。RT-PCR采用两步法，按试剂说明书进行。HPSE引物序列按照文献[7]设计，上游5'TTCGATCCCAAGAAGGAATCAAC 3'，下游5'GTAGTGATGCCATGTAACTGAATC3'，其扩增片段长度为584 bp。引物按要求将其浓度稀释为20 pmol/μl，按50 μl反应体系扩增。其扩增条件为94℃预变性4 min，后转入94℃变性30 s、63℃退火30 s、72℃延伸45 s，35个循环，72℃充分延伸7 min。实验中以持家基因β-肌动蛋白(β-actin)为内参照。取8 μl产物于1.0%的琼脂糖凝胶上电泳，以Fluor-S多功能呈像系统扫描

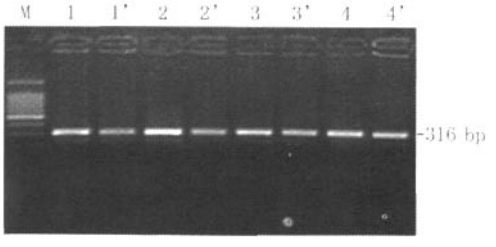
拍照。

1.2.8 Western blot 检测 HPSE 蛋白表达的变化：取共转染48 h 的各组A375 细胞(各组复3 孔)，加入蛋白抽提试剂，冰浴裂解 15 min 后离心取上清，取 50 μg 总蛋白进行 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳，半干转移至 PVDF 膜，膜在 5% BSA 溶液中室温孵育 1 h 以封闭膜上的非特异结合。封闭过的膜加入 HPSE 一级抗体(1∶1 000稀释)4℃过夜，TBS/T 洗膜 3 次。加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二级抗体，室温作用1 h，TBS/T 洗膜3 次。将膜置于化学发光试剂盒反应液中室温孵育 5 min 后胶片曝光。实验中以持家基因β-actin 为内参照。图片扫描保存为电脑文件，并用Image J 分析软件将图片上每个特异条带的灰度值数字化。

1.3 统计学处理 资料整理与分析采用统计软件SPSS 10.0，对多组数据进行方差分析。统计学显著性检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 PCR 鉴定转化菌 用引物扩增转化菌重组质粒pRNATU6.1/HPSE-siRNA，结果见图1。转化菌1(1')至4(4')均出现316 bp 扩增产物，提示转化菌 1 至转化菌 8 的质粒均为pRNATU6.1/HPSE-siRNA。目的条带为316 bp。



M：DNA 标记物；1-1'：siRNA1 对应的 2 个菌落 PCR 检测结果；2-2'：siRNA2 对应的两个菌落 PCR 检测结果；3-3'：siRNA3 对应的两个菌落 PCR 检测结果；4-4'：siRNA-Negative 对应的 2 个菌落 PCR 检测结果

图1 PCR 扩增转化菌重组质粒

Fig. 1 The PCR-amplification outcome of recombinant plasmids

2.2 测序鉴定转化菌 重组的阳性载体 pRNATU6.1/HPSE-siRNA 测序的结果，与设计靶向HPSE 的寡核苷酸序列比较结果完全一致；重组阴性对照载体 pRNATU6.1/Negative-siRNA测序的结果，与设计的阴性对照的寡核苷酸序列比较结果完全一致，成功构建出靶向 HPSE 的 siRNA 表达载体和阴性对照载体(图2)。

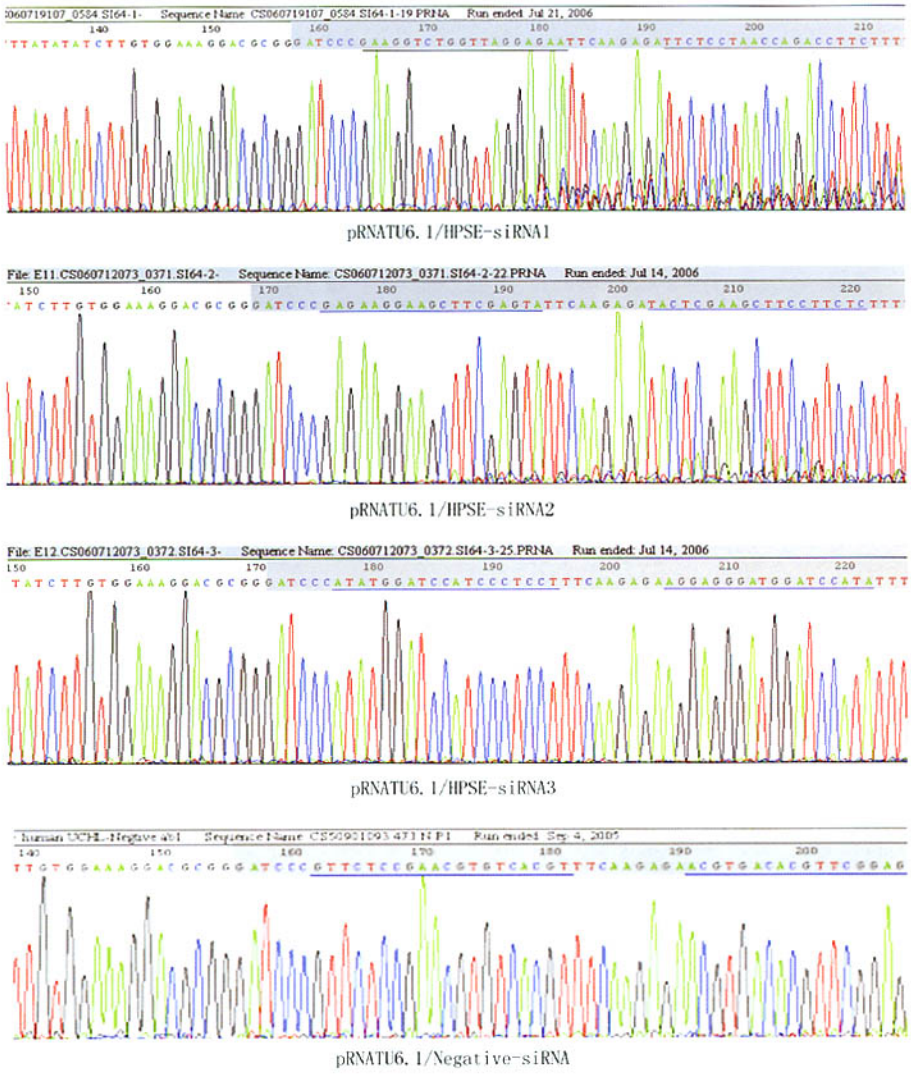
2.3 荧光显微镜观察重组质粒转染A375 细胞的效率 转染 48 h 转染效率达到了 60%～70%，荧光照片如图3 所示。

2.4 RT-PCR 检测受干扰后HPSE-mRNA 的表达变化 用上述重组 pRNATU6.1/HPSE-siRNA载体及 pRNATU6.1/Negative-siRNA 载体分别转染人恶性黑素瘤 A375 细胞 48 h 后，用 RT-PCR 检测 HPSE 基因表达，结果显示，Lipofectamine^{M} 2000 组和 Negative-siRNA 组 HPSE 基因的表达水平与空白对照组比较，差异无统计学意义($F=0.20$，$P>0.05$)。而各 pRNATU6.1/HPSE-siRNA 转染组细胞 HPSE 基因的表达水平较空白对照组显著降低($F=37.76$，$P<0.01$)，提示细胞中 HPSE-mRNA被有效降解(图 4)，其中尤以 HPSE1-siRNA组最为明显，可达65.0%。

2.5 Western blot 检测受干扰后 HPSE 蛋白的表达变化 重组质粒分别转染各实验组 A375 细胞，48 h 后空白对照组、Lipofectamine^{M} 2000 组、Negative-siRNA 组以及 HPSE-siRNA1 组、HPSE-siRNA2 组、HPSE-siRNA3组蛋白的相对表达量分别为 0.59±0.07、0.50±0.05、0.50±0.05、0.29±0.08、0.35±0.03 和 0.32±0.02。与空白对照组比较，Lipofectamine^{M} 2000 组和 Negative-siRNA 组 HPSE 蛋白的表达无明显下降($F=1.021$，$P>0.05$)，而 3 个实验组 HPSE 蛋白的表达明显降低($F=29.80$，$P<0.05$)，提示 HPSE-siRNA 能有效抑制HPSE 蛋白的表达。其中以HPSE1-siRNA 的抑制效率最为明显，其抑制率为51.3%(图5)。

3 讨 论

细胞外基质是肿瘤侵袭和转移的天然屏

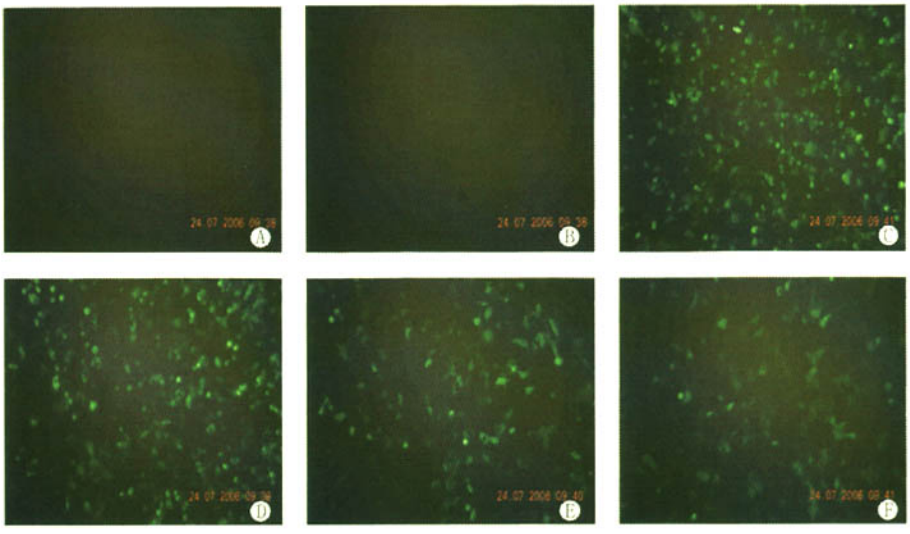


图片的阴影部分代表所设计的寡核苷酸序列

图 2　重组阳性载体pRNATU6. 1/HPSE-siRNA 的测序结果

Fig. 2　The sequencing outcome of recombinant plamids pRNATU6. 1/HPSE-siRNA

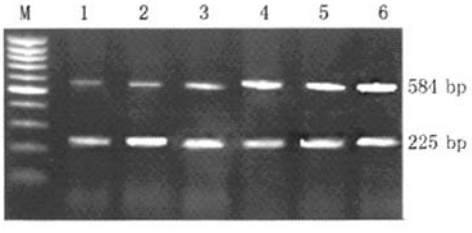
障，主要成分是结构蛋白和蛋白多糖等，细胞外基质的降解和基底膜的破坏是肿瘤侵袭和转移的一个关键步骤。近年来发现的HPSE 是一种能裂解细胞外基质和基底膜内硫酸乙酰肝素蛋白多糖的内源性糖苷内切酶，这使HPSE 成为研究抗肿瘤转移的新靶点。我们前期的研究发现，苦参碱可能通过抑制 HPSE 的表达而抑制A375 细胞的粘附和侵袭能力[8]。为了进一步阐明HPSE 在恶性黑素瘤及其他肿瘤侵袭转移中的作用机制，本研究构建了 HPSE siRNA 表达载体，并观察了 HPSE siRNA 的沉寂作用。并经半定量PCR 和Western blot 初步证实HPSE



A:空白对照组;B:Lipofectamine^{M} 2000 组;C:Negative-siRNA 组;D:HPSE-siRNA1 组;E:HPSE-siRNA2 组;F:HPSE-siRNA3 组

图 3 荧光显微镜观察重组质粒转染 48 h 后的荧光表达情况

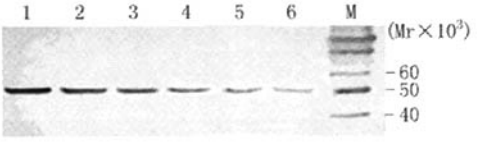
Fig. 3 The expressions of recombinant plasmids after transfection for 48 h were observed through fluorescence microscope



M:DNA 标记物;1:HPSE-siRNA1 组;2:HPSE-siRNA2 组;3:HPSE-siRNA3 组;4:Negative-siRNA 组;5:Lipofectamine^{M} 2000 组;6:空白对照组

图 4 半定量 RT-PCR 检测 RNA 干扰 48 h 后各组 HPSE-mRNA 的表达

Fig. 4 Semi-quantitative PCR was performed to evaluate the heparanase-mRNA expression levels after RNAi for 48 h



1:空白对照组;2:Lipofectamine^{M} 2000 group 组;3:Negative-siRNA 组;4:HPSE-siRNA3 组;5:HPSE-siRNA2 组;6:HPSE-siRNA1 组

图 5 Western blot 检测 RNA 干扰 48 h 后各组 HPSE 蛋白的表达

Fig. 5 Western blot was performed to evaluate the expression levels of HPSE protein after RNAi for 48 h

-siRNA 能有效抑制 HPSE 基因和蛋白的表达，其中 HPSE-siRNA1 的抑制效率最大。这就为后期进行肿瘤细胞稳定转染以及体内、体外侵袭转移的相关实验打下了基础，并有助于阐明 HPSE 在 MM 及其他肿瘤侵袭转移中的作用机制，拓展肿瘤转移基因治疗的新思路，为进一步研制更有效的抗 MM 的基因药物提供实验依据和理论基础。

References:

[1] JOYCE J A, FREEMAN C, MEYER M N, et al.

A functional heparan sulfate mimetic implicates both heparanase and heparan sulfate in tumor angiogenesis and invasion in a mouse model of multistage cancer [J]. **Oncogene**, 2005, 24(25): 4037-4051.

[2] BECKHOVE P, HELMKE B M, ZIOUTA Y, et al. Heparanase expression at the invasion front of human head and neck cancers and correlation with poor prognosis [J]. **Clin Cancer Res**, 2005, 11(8): 2899-2906.

[3] BRUMMELKAMP T R, BERNARDS R, AGAMI R. A system for stable expression of short interfering RNAs in Mammalian cells [J]. **Science**, 2002, 296(5567): 550-553.

[4] XU Ning, YANG Zheng-gang, ZHU Hai-hong, et al(徐　宁，羊正纲，朱海红，等). Inhibition of HBV core antigen gene expression in human embryonic kidney cell line AD293 by plasmid-based RNAi [J]. **Journal of Zhejiang University: Medical Sciences**(浙江大学学报：医学版), 2005, 34(2): 104-109. (in Chinese)

[5] YANG Zheng-gang, CHEN Zhi, NI Qin, et al(羊正纲，陈　智，倪　勤，等). Inhibition of HBs-GFP fusion gene expression by RNA interference [J]. **Journal of Zhejiang University: Medical Sciences**(浙江大学学报：医学版), 2005, 34(2): 110-115. (in Chinese)

[6] PAN Xiu-cheng, CHEN Zhi, NI Qin, et al(羊正纲，陈　智，倪　勤，等). Application of PCR-based tRNAval Pol Ⅲ-shRNA expression cassettes in screening of efficient siRNA for inhibiting hepatitis B virus [J]. **Journal of Zhejiang University: Medical Sciences**(浙江大学学报：医学版), 2006, 35(2): 154-160. (in Chinese)

[7] UNO F, FUJIWARA T, TAKATA Y, et al. Antisense-mediated suppression of human heparanase gene expression inhibits pleural dissemination of human cancer cells. **Cancer Res**, 2001, 61(21): 7855-7860.

[8] LIU Xiao-yan, FANG Hong, TENG Li-song, et al(刘晓艳，方　红，滕理送，等). Inhibitory effect of matrine on invasiveness and metastasis of human malignant melanoma cell line A375 *in vitro*. **Chinese Journal of Dermatology**(中华皮肤科杂志), 2006, 39(6): 331-334. (in Chinese)

[责任编辑　黄晓花]

《Molecular Pharmaceutics》主编 Gordon L Amidon 教授等一行访问我校药学院

近日，在全球药剂学领域享有盛誉的美国密歇根大学著名教授Gordon L Amidon等一行应邀访问了浙江大学药学院，常务副院长曾苏教授和药物制剂研究所领导接待了来宾，向客人们介绍了药学院的基本情况，并陪同参观了学院实验室。Dr Amidon教授等对药学院的发展给予了高度评价，并就双方的合作与药学院方面进行了探讨。

Gordon L Amidon教授是分子药剂学倡导人、药物的生物分类系统(Biopharmaceutics Classification System，BCS)的发明者和美国药学科学家协会(AAPS)前主席及《Molecular Pharmaceutics》主编，在全球药剂学领域享有盛誉。

访问期间，Gordon L Amidon教授介绍了药物的生物分类系统和药品生物等效性的体外评价方法及其在药物制剂质量控制中的应用，还作了题为"A Biopharmaceutics Classification System (BCS)"的学术报告，并与学院师生就分子药剂学的发展等有关问题进行了深入的交流。